

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

REC'D 08 OCT 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 40 260.8

**Anmeldetag:** 29. August 2003

**Anmelder/Inhaber:** Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich/DE

**Bezeichnung:** Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

**IPC:** A 61 K, C 12 N, A 61 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 23. September 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Dzlerzon

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



26.08.2003

## Beschreibung

Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von  
TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

Die Erfindung betrifft ein Mittel und ein Verfahren zur Behandlung und zur Prävention von TSE, sowie ein Verfahren zur Herstellung des Mittels.

Das Auftreten der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE) wird nach Ergebnissen der jüngeren medizinischen Forschung ursächlich mit Prionen in Verbindung gebracht. Die Krankheit zeichnet sich durch schwammartige Veränderungen im Gehirn aus. Als Haupt-Krankheitserreger wurden Prione identifiziert. Prione bestehen überwiegend aus Prionprotein (PrP) in einer pathogenen Konformation ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ). Auch der gesunde Organismus produziert Prionprotein, allerdings in einer nicht pathogenen, ungefährlichen Konformation ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ).  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  besitzen die gleiche Aminosäuresequenz, zeigen jedoch einen erheblichen Unterschied in der Sekundärstruktur.  $\text{PrP}^{\text{C}}$  enthält einen relativ hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil und fast keine  $\beta$ -Faltblatt-Elemente.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  hingegen weist mit einem erhöhten  $\beta$ -Faltblatt-Anteil und geringeren  $\alpha$ -Helix-Anteil eine von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  verschiedene Sekundärstruktur auf. Demnach handelt es sich bei  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  um Strukturisomere. Außerdem ist  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  im Gegensatz zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  resistent gegen Proteinase-K-Verdau. Dabei scheint  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  posttranslational aus  $\text{PrP}^{\text{C}}$  gebildet zu werden. Entstehung und Entwicklung der Krankheit sind abhängig von der fortgesetzten Umwandlung

F:\Weranek\Anmeldungen\Katscher\2003\OB150 - Mittel u. Verf. z. Behandl. u. Prävention v. TSE ...  
25.08.03.dnn

lung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>. Die Faktoren die für die Umwandlung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> verantwortlich sind, sind noch nicht alle bekannt.

Alle bisher verfolgten Ansätze zu einer TSE-Therapie haben die Suche nach Wirkstoffen zum Ziel, die gezielt und spezifisch an PrP<sup>Sc</sup> binden oder dessen Bindung an PrP<sup>C</sup> blockieren sollen, wie es in der Veröffentlichung von C.Soto Biochem. Soc. Trans. 2002 Aug. 30(4): 569-574 zusammengefasst wird.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung einen pharmazeutischen Wirkstoff und ein alternatives Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit denen die Krankheit TSE geheilt, gelindert oder präventiv behandelt werden kann.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine Verlangsamung und sogar Inhibierung der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung bewirkt werden kann, wenn prioninfizierten Zellen bestimmte Peptide, zugeführt werden. Hierbei wird angenommen, dass sich die erfindungsgemäßen Peptide an das PrP<sup>C</sup> anlagern und so die Umwandlung von natürlich vorkommendem PrP<sup>C</sup> in das pathogene PrP<sup>Sc</sup> Verhindern. Es wurden erfindungsgemäß verschiedene Peptide mit teilweise charakteristischen Aminosäure - Untersequenzblöcken identifiziert, die eine Linderung der Symptomatik oder sogar eine Heilung der Krankheit TSE zur Folge haben. Beispiele für Peptide sind in den Sequenzen 1 bis 27 angegeben. Als erfindungsgemäß einsetzbare Peptide wurden folgende Sequenzen identifiziert, die in Richtung Amino- zu Carboxylterminus zu lesen sind, von denen eine

Komponente oder ein Gemisch aus mindestens zwei Komponenten zur Behandlung eingesetzt werden können:

Alle Sequenzen die mindestens eine Komponente aus mindestens einer der Gruppen bestehend aus

5. A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln und Pro,  
Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und Ser, Arg und His,  
Thr und Tyr, Val und Tyr, Arg und Pro, Pro und Leu,  
Leu und Pro, Pro und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys,  
Lys und Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn,  
Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu und Met,  
Met und Met, Met und Tyr, Trp und His, His und Trp,  
Trp und Gln, Gln und Trp, Trp und Thr, Thr und Pro,  
Pro und Trp, Trp und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln,  
Gln und Pro.

10 B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met, Asp, Met  
und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp und Val und Gln,  
Val und Gln und Pro, Gln und Pro und Leu, Gln und  
Pro und Met, Pro und Leu und Thr, Leu und Thr und  
Pro, Leu und Asp und Ser, Asp und Ser und Ser, Asp  
und Ser und Cys, Arg und His und Ala, His und Ala  
und Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und Ser,  
Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu, Pro und  
Leu und Pro, Leu und Pro und Ser, Pro und Ser und  
Pro, Leu und Lys und Ala, Lys und Ala und Thr, Ala  
und Thr und Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn  
und Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und Leu,  
Lys und Leu und Met, Leu und Met und Met, Met und  
Met und Tyr, Trp und His und Trp, His und Trp und  
Gln, Trp und Gln und Trp, Gln und trp und Thr, Trp

15

20

25

und Thr und Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp und Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und Gln, Ile und Gln und Pro.

- 5 C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und Ile und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg und His und Ala und Thr, His und Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu und Pro, Pro und Leu und Pro und Ser, Leu und Pro und Ser und Pro, Leu und Lys und Ala und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr, Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys, Asn und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu und Met, Lys und Leu und Met und Met, Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln, His und Trp und Gln und Trp, Trp und Gln und Trp und Thr, Gln und Trp und Thr und Pro, Trp und Thr und Pro und Trp, Thr und Pro und Trp und Ser, Pro und Trp und Ser und Ile, Trp und Ser und Ile und Gln, Ser und Ile und Gln und Pro.
- 10 D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Met und Ile und Asn und Asp und Val, Ile und Asn und Asp und Val und Gln, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und Pro und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg, Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Thr und
- 15
- 20
- 25
- 30

Asn und Ser und Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und Lys und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp, His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und Trp und Thr und Pro und Trp, Trp und Thr und Pro und Trp und Ser, Trp und Thr und Pro und Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und Ile und Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro.

10 E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, His und Ser und Pro und Leu und Asp und Ser, Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,

15 Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met, Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und Trp, Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro.

20 F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg uns His und Ala, Ser und Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,

Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,  
 Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr und Pro,  
 Gln und Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,  
 Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro.

5        G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens einer der Gruppen A) bis F).

H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, welche alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1 - 12 umfassen, sind oder enthalten. Diese Sequenzen können eine beliebige Länge haben, vorzugsweise eine Länge von 6 - 40, besonders bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 oder noch bevorzugter 10-12 Aminosäuren lang sein.

10      In einigen speziellen Ausführungsformen können die folgenden Sequenzen vorliegen, die vorzugsweise 12 Aminosäuren lang sind.

I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten.

20      J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen.

K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten.

25      L) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen.

7

- M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9  
die Aminosäuren Arg und His besitzen.
- N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 11 und 12  
die Aminosäuren Thr und Tyr besitzen.
- 5 O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der  
Gruppen L), M) und N).
- P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2  
die Aminosäuren Val und Tyr besitzen.
- 10 Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9,  
10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser  
und Pro besitzen K Asn und Ser und Lys und Leu und  
Met und Met.
- R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus N) und  
O) darstellen.

15

Die Sequenzabschnitte I) - R) können in Sequenzen ent-  
halten sein, die beispielsweise eine Länge von 6 - 40,  
bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 und besonders bevorzugt 10 -  
12 Aminosäuren umfassen.

20

Die erfindungsgemäßen Peptide, welche eine Heilung von  
TSE oder eine Linderung bewirken, können nach bekannten  
Verfahren hergestellt werden.

25

So kann zur Herstellung eines chemisch-synthetischen  
Verfahrens zum Beispiel Festphasensynthesen oder eine  
Synthese in flüssigem Medium herangezogen werden. Bei  
der Festphasensynthese werden die Aminosäuren in der

Abfolge der Sequenz entsprechend den Sequenzprotokollen und der Auflistungen A) - R) miteinander verbunden. Die Festphasenpeptidsynthese besteht aus drei wesentlichen Schritten:

- 6 1) Aufbau der Aminosäurekette zum Peptid,
- 2) Spaltung des synthetisierten Peptids vom Harz und
- 3) Gegebenenfalls Reinigung und Charakterisierung.

Für die Synthese der Aminosäurekette sind unterschiedliche Kopplungsmethoden bekannt, wie Sie beispielsweise in „Beyer Walter“ 22. Auflage ISBN 3-7776-0485-2, Seiten 829 - 834 beschrieben werden.

15 Die Peptide können auch durch Expression der für sie kodierenden Nukleotidsequenzen, zum Beispiel in Chromosomen, Plasmiden oder anderen Informationsträgern, nackte DNA oder RNA in Organismen, in Zellen oder zellfreien Systemen, hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher auch die Nukleinsäuren, welche für die Peptide gemäß den Aminosäuresequenzen A) - R) kodieren, einschließlich aller Allelvariationen sowie die Nukleotidsequenzen der Sequenzfolgen 1 - 27 einschließlich aller Allelvariationen.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden können alle Säugetiere einschließlich Menschen behandelt bzw. geheilt werden und die Peptide können auch zur Prävention eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die Behandlung des Menschen es können aber auch Rinder und Schafe behandelt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide lagern an das PrP<sup>c</sup> aller Säuger an, so dass die erfindungsgemäße Wirkung stattfinden kann. Der erfindungsgemäße Effekt

findet auch statt, wenn mindestens zwei der genannten Peptide an das PrP<sup>c</sup> binden.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden kann eine Behandlung der Krankheit TSE sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vorgenommen werden. Zu den humanen Erkrankungen gehören das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und FFI (Fatal Familial Insomnia). Beim Tier sind ebenfalls TSE- Erkrankungen bekannt, z. B. beim Schaf Scrapie, beim Rind bovine spongiforme encephatlopathie (BSE) bei Wildtieren chronic wasting disease (CWD).

Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appliziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, vorzugsweise Wasser gelöster Form in den Körper eingebracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff und die pharmazeutische Zusammensetzung können als flüssige, halbfeste oder feste Arzneiformen und in Form von z. B. Injektionslösungen, Tropfen, Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granulaten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeutischen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Salben, Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aerosolen vorliegen und verabreicht werden und enthalten die erfindungsgemäßen Peptide in einer physiologisch verträglichen Form und in Abhängigkeit des Applikationsweges

pharmazeutische Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, oberflächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Sprangmittel, Gleitmittel, Schmiermittel, Aromen und/oder Bindemittel. Diese Hilfsmittel können beispielweise sein: Wasser, Ethanol, 2-Propanol, Glycerin, Fructose, Laktose, Saccharose, Dextrose, Melasse, Stärke; modifizierte Stärke, Gelatine, Sorbitol, Inositol, Mannitol, mikrokristalline Cellulose, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetat, Schellack, Cetylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Paraffine, Wachse, natürliche und synthetische Gummis, Akaziengummi, Alginat, Dextran, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Zinkstearat, Glycerylstearat, Natriumlaurylsulfat, genießbare Öle, Sesamöl, Kokosnussöl, Erdnussöl, Sojabohnenöl, Leцитin, Natriumlactat, Polyoxyethylen- und -propylenefttsäureester, Sorbitanfettsäureester, Sorbinsäure, Benzoesäure, Zitronensäure, Ascorbinsäure, Tanninsäure, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumoxid, Zinkoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Titandioxid, Magnesiumsulfat, Zinksulfat, Calciumsulfat, Pottasche, Calciumphosphat, Dicalciumphosphat, Kaliumbromid, Kaliumjodid, Talkum, Kaolin, Pectin, Crospovidon, Agar und Bentonit.

Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie der einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Medikament oral, subkutan, parenteral, intravenös, pulmonal, intraperitoneal, transdermal, intramuskulär, nasal, buccal, rektal oder auf andere geeignete Weise appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen

sich u. a. Zubereitungen in Form von Tabletten, Dra-  
gees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen,  
für die parenterale, topische und inhalative Applikati-  
on Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstruierbare Pul-  
ver zur Inhalation sowie Sprays. In geeigneten perkuta-  
nen Applikationsformen kann der Wirkstoff in einem De-  
pot in gelöster Form oder in einem Pflaster, gegebenen-  
falls unter Zusatz von Hautpenetrationen fördernden  
Mitteln, vorliegen. Rektal, transmucosal, parenteral,  
oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können  
die erfindungsgemäßen Peptide verzögert freisetzen.

In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide  
beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subku-  
tan, intramuskulär, inhalativ oder in oder neben das  
Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die er-  
findungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes  
aufgebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an  
anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nuk-  
leinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon),  
die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, in den  
Organismus eingebracht werden. Dies kann durch virale  
Vektoren, nackte Nukleinsäure (DNA, RNA), Plasmide,  
künstliche Viruspartikel, Liposomen erreicht werden,  
die intravenös, intranasal, oral, rektal, subkutan, in-  
tramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper  
eingebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zur Präven-  
tion der oben genannten Krankheiten verwendet werden.  
Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appli-

ziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, (vorzugsweise Wasser) gelöster Form in den Körper eingebracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.

5 In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subkutan, intramuskulär, inhalativ oder in bzw. neben das Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes 10 aufgebracht werden.

15 Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nukleinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon) die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren in den Organismus eingebracht werden. Dies kann erreicht werden durch virale Vektoren, nackte Nukleinsäuren (DNA, RNA), Plasmide, künstliche Viruspartikel, Liposomen, die intravénös, intranasal, oral, rektal, subkutan, intramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper 20 eingebracht werden.

25 Zur Verbesserung der Bindungs-, Lösungs-, und Wirkegenschaften können die erfindungsgemäßen Peptide noch modifiziert werden, so dass die Wasserlöslichkeit, deren Stabilität, die Bioverfügbarkeit und die Affinität zum Anhaften am PrP<sup>c</sup> vergrößert wird. Diese Modifikati-

onen können beispielsweise Zuckerreste, Glukoronsäuren, Sulfatreste, Serin, Glycin oder Aspartat sein.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide mit Antikörpern oder Fragmenten davon auf übliche Weise verknüpft werden, um bei einer therapeutischen Anwendung des erfindungsgemäßen Proteins Bestandteile des Immunsystems zu aktivieren.

Als zu behandelnde Krankheitsbilder können das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom sowie Fatal Familia Insomnia (FFI) beispielhaft genannt werden.

Methodisches:

Phagendisplay ist eine Technik, die es ermöglicht Peptid-Bibliotheken mit randomisierten Aminosäuresequenzen zu konstruieren und diese nach Liganden für ein bestimmtes Zielmolekül zu durchsuchen. Die Peptidbibliothek ist dabei als Fusion aus Peptid und einem Phagenhüllprotein auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert ("phage display"). Die Diversität der präsentierten Peptide wird durch die Insertion einer kombinatorisch mutierten DNA als Peptid-kodierender Teil des Fusionsgens erreicht. Auf diese Weise wird eine extrem große Zahl von Phagen erzeugt, wobei jeder Phage ein anderes Peptid präsentiert. Das Konstruieren, Vermehren und Selektieren wird als "Biopanning" bezeichnet. Die Bibliothek wird mit einem immobilisierten Zielmolekül inkubiert, wobei der nicht-bindende Teil der Peptid-Bibliothek weggewaschen und der bindende Teil anschlie-

ßend eluiert wird. Die dadurch angereicherte Population von Phagen, die ein mit dem Zielmolekül interagierendes Peptid präsentieren, werden amplifiziert, indem man mit ihnen Bakterien infiziert. Die Screening-Amplifikations-Prozedur kann mehrmals wiederholt werden, um die Bibliotheks-Mitglieder weiter anzureichern, die eine relativ höhere Affinität zum Zielmolekül besitzen. Das Ergebnis ist eine Peptid-Population, die dominiert wird von den Aminosäuresequenzen, die das Zielmolekül am besten binden.

Verwendet wurde eine kommerzielle Phagenbibliothek mit 12 randomisierten Aminosäuren (New England Biolabs, Frankfurt). Hier ist an das Phagenhüllprotein kodierende gp3-Gen nach der Signalsequenz N-terminal die Bibliothek inseriert. Diese besteht aus  $1,9 \times 10^9$  unabhängigen Klonen und ist so amplifiziert und konzentriert, dass in 10 µl durchschnittlich jede Sequenz in 55 Kopien vorliegt.

Zur Durchführung der Selektion gegen das rekombinante Prionprotein (rPrP) aus Hamster wurde rekombinant hergestelltes Hamster-Prionprotein in einer Konzentration zwischen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml in PBS mit 0,2% SDS, pH 7,2 mit Hilfe des "Protein Immobilizer Kit" (Exiqon) in einer Mikrotiterplattenvertiefung immobilisiert. Hierfür wurden jeweils 100 µl Proteinlösung für 2 Stunden unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde 3 mal mit 200 µl PBS gewaschen.

Für die Selektion wurden 10 µl Phagen der kommerziellen Phagenbibliothek in 100 µl PBST mit 0,1% BSA 10 Minuten

unter leichtem Schütteln in einer rPrP-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefung inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden verworfen und anschließend 10 mal mit 300 µl PBST gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für 10 Minuten unter leichtem Schütteln. Das Eluat wurde in 15 µl Tris-HCl, pH 9, 1 neutralisiert.

Das Eluat wurde in 20 ml *E. coli*-Kultur gegeben und für 4,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde nun über Nacht bei 4 °C gefällt. Danach wurde 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde auf Eis gefällt. Abschließend wurde 60 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TBS resuspendiert. Die so erhaltenen Phagen konnten nun in der nächsten Runde eingesetzt werden. Insgesamt wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt. Anschließend wurden willkürlich ausgewählte Phagenklone isoliert und die Aminosäuresequenz der auf diesen Phagen präsentierten Peptide über den Umweg der DNA-Sequenzierung des im Phagengenom kodierten Peptids bestimmt. Das Ergebnis sind die insgesamt 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll.

In einem Zellkulturessay mit infizierten N2a-Zellen wurde gezeigt, dass alle untersuchten Peptide in der

Lage waren, die Menge an gebildetem PrP<sup>sc</sup> zu verringern.

Beispiel:

#### Versuchsbeschreibung

- 5 Prion infizierte Zellen werden eine Woche lang kultiviert und dann auf die Bildung von PrP<sup>sc</sup> hin untersucht. Dies funktioniert so, dass man die Zellen lysiert und mit 20 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Durch wird PrP<sup>c</sup> verdaut und nur das PK-resistente PrP<sup>sc</sup> bleibt übrig. Das PK-behandelte Zelllysat wird einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen und auf eine Membran geblottet und anschließend mit einem PrP-spezifischen Antikörper angefärbt ("Western-Blot"). Figur 1 zeigt das Bandenmuster des PK-behandelten Zelllysats. Die Peptide W1, W2, W3 und W4 entsprechen dabei den Sequenzen 8, 2, 10 und 1 gemäß dem Sequenzprotokoll. Dabei entsteht ein typisches Bandenmuster (siehe Spur 1 in der unteren Abbildung).
- 10 20 In Anwesenheit von Substanzen, die die Vermehrung von Prionen inhibieren (Quinacrine als positive Kontrolle) ist kein oder ein deutlich schwächeres Bandenmuster zu sehen (Spur 2 und 3).
- 15 25 Bei Behandlung der Prion infizierten N2a-Zellen mit den Peptiden W1, W2, W3 und W4 ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der PrP-Banden im Westernblot zu sehen (Übrige Spuren). Das bedeutet, dass die Peptide inhibierend auf die Replikation der Prionen wirken.

17

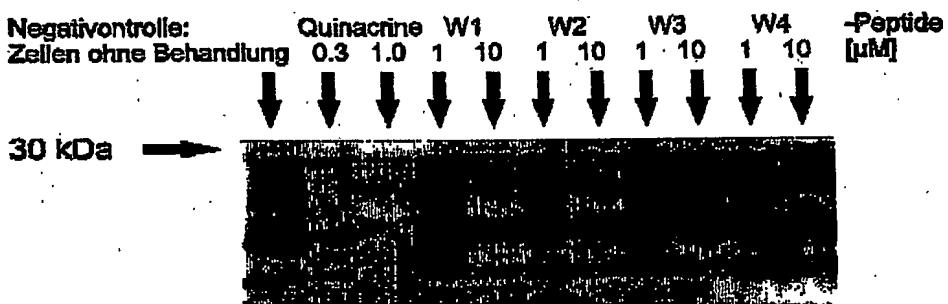


Fig. 1

Hier die Aminosäuresequenzen (im Einbuchstabencode) der vier wirksamen Peptide, die im Phagendisplay-Screening identifiziert wurden:

- "W1" HSPLDSSSRHATY = Seq.Nr.8
- "W2" VDMINDVQPLTP = Seq.Nr.2
- "W3" VYSSTTRPLPSP = Seq.Nr.10
- "W4" LKATTNSKLMMY = Seq.Nr.1

10

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Mittel,

dadurch gekennzeichnet,

dass es mindestens eine Komponente aus mindestens einer der Gruppen A) bis R) ist oder umfasst:

5           A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln und Pro, Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und Ser, Arg und His, Thr und Tyr, Val und Tyr, Arg und Pro, Pro und Leu, Leu und Pro, Pro und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys, Lys und Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn, Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu und Met, Met und Met, Met und Tyr, Trp und His, His und Trp, Trp und Gln, Gln und Trp, Trp und Thr, Thr und Pro, Pro und Trp, Trp und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln, Gln und Pro.

10           B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met, Asp, Met und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp und Val und Gln, Val und Gln und Pro, Gln und Pro und Leu, Gln und Pro und Met, Pro und Leu und Thr, Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser, Asp und Ser und Ser, Asp und Ser und Cys, Arg und His und Ala, His und Ala und Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und Ser, Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu, Pro und Leu und Pro, Leu und Pro und

26.08.2003

19

Ser, Pro und Ser und Pro, Leu und Lys und  
Ala, Lys und Ala und Thr, Ala und Thr und  
Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn und  
Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und  
Leu, Lys und Leu und Met, Leu und Met und  
Met, Met und Met und Tyr, Trp und His und  
Trp, His und Trp und Gln, Trp und Gln und  
Trp, Gln und trp und Thr, Trp und Thr und  
Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp und  
Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und  
Gln, Ile und Gln und Pro.

5  
10  
15  
20  
25

C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und  
Ile und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg  
und His und Ala und Thr, His und Ala und Thr  
und Tyr, Val und Tyr und Ser und Ser, Arg und  
Pro und Leu und Pro, Pro und Leu und Pro und  
Ser, Leu und Pro und Ser und Pro, Leu und Lys  
und Ala und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr,  
Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und Thr und  
Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys, Asn  
und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu  
und Met, Lys und Leu und Met und Met, Leu und  
Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und  
Gln, His und Trp und Gln und Trp, Trp und Gln  
und Trp und Thr, Gln und Trp und Thr und Pro,  
Trp und Thr und Pro und Trp, Thr und Pro und  
Trp und Ser, Pro und Trp und Ser und Ile, Trp  
und Ser und Ile und Gln, Ser und Ile und Gln  
und Pro.

D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Met und Ile und Asn und Asp und Val, Ile und Asn und Asp und Val und Gln, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und Pro und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg, Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und Lys und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp, His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und Trp und Thr und Pro und Trp, Trp und Thr und Pro und Trp und Ser, Trp und Thr und Pro und Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und Ile und Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro.

E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, His und Ser und Pro und Leu und Asp und Ser, Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,

Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu,  
Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met,  
Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,  
Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,  
Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr,  
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und Trp,  
Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser  
und Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln  
und Pro.

- 5
- 10 F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr  
und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg  
uns His und Ala, Ser und Ser und Arg und His  
und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala  
und Thr und Thr und Asn und Ser, Lys und Ala  
und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys, Ala  
und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und  
Leu, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und  
Leu und Met, Thr und Asn und Ser und Lys und  
Leu und Met und Met, Asn und Ser und Lys und  
Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und  
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und  
Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,  
Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln  
und Pro.
- 15
- 20
- 25 G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens  
einer der Gruppen A) bis F).
- H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, wel-  
che alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1  
- 12 umfassen.

- 24
- I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten.
- 5 J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen.
- 10 K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten.
- M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen.
- 15 N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9 die Aminosäuren Arg und His besitzen.
- O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der Gruppen L), M) und N).
- P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2 die Aminosäuren Val und Tyr besitzen.
- 20 Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser und Pro besitzen, K Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met.

- R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus  
N) und O) darstellen.
2. Mittel nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es in fester, halbfüssiger oder flüssiger  
Form vorliegt.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es in Form von Injektionslösungen, Tropfen,  
Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granula-  
ten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeuti-  
schen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Sal-  
ben, Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aero-  
solen vorliegt.
- 15 4. Mittel nach Anspruch 3  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien,  
Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, ober-  
flächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungs-  
stoffe, Sprengmittel, Gleitmittel, Schmiermittel,  
20 Aromen und/oder Bindemittel enthält.
- 25 5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass es mit mindestens einer Komponente aus der  
Gruppe Zuckerreste, Glukuronsäuren, Sulfatreste,  
Serin, Glycin oder Aspartat modifiziert bzw. sub-  
stituiert sind.

6. Nukleinsäure, kodierend für die Peptide nach Anspruch 1.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass sie eine DNA, eine RNA, eine mRNA oder eine  
Mischung aus mindestens zwei Komponenten davon ist.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass sie als nackte Nukleinsäure oder verpackte  
Nukleinsäure, als Vektor, Plasmid, in Liposomen  
eingebunden oder als Phage vorliegt.
9. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Festphasensynthese oder eine Synthese in  
flüssiger Phase eingesetzt wird.
10. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass ein Peptid nach Anspruch 1 aus einer für diese  
Peptidsequenz kodierenden Nukleinsäure exprimiert  
wird.
11. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels.
12. Heil- und Behandlungsverfahren sowie Verfahren zur Prävention der Krankheit TSE,  
dadurch gekennzeichnet,

26.08.2003

25

dass an den Patienten ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 6 bis 8 verabreichtet wird.

F:\Weranek\Anmeldungen\Katscher\2003\OB150 - Mittel u. Verf. z. Behandl. u. Prävention v. TSE ... -  
25.08.03.rnm

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von  
TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

Die Erfindung betrifft ein Mittel bzw. einen pharmazeutischen Wirkstoff und ein Verfahren zur Behandlung, Prävention und Diagnose von TSE, sowie ein Verfahren zur Herstellung des Mittels bzw. pharmazeutischen Wirkstoffes. Erfindungsgemäß werden Peptide bzw. für diese Peptide kodierende Nukleotidsequenzen zur Verfügung gestellt, welche in den Sequenzprotokollen 1 bis 27 sowie Teilsequenzen davon offenbart sind.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden kann eine Behandlung oder Prävention der Krankheit TSE zum Beispiel beim Menschen Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und FFI (Fatal Familial Insomnia) vorgenommen werden. Beim Tiere sind TSE-Erkrankungen bekannt, beim Schaf Scrapie, beim Rind BSE und bei Wildtieren CWD.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Juelich GmbH

<120> Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

<130> PT1.2095

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 1

Leu Lys Ala Thr Thr Asn Ser Lys Leu Met Met Tyr  
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 2

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro  
1 5 10

<210> 3

<211> 12

29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 3

Val Asp Met Ile Asp Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro

1

5

10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 4

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Met Thr Pro

1

5

10

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 5

Val Tyr Met Met Asn Asn Gly Gln Pro Pro Ser Pro

1

5

10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

BO

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 6

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Met Ser Pro

1

5

10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 7

Trp His Trp Gln Trp Thr Pro Trp Ser Ile Gln Pro

1

5

10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 8

His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg His Ala Thr Tyr

1

5

10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 9

His Tyr Thr Leu Asp Ser Cys Arg His Pro Thr Tyr  
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 10

Val Tyr Ser Ser Thr Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro  
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 11

Val Tyr Ser Ser Asn Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro  
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 12

Val Tyr Ser Ser Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro

1

5

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 13

Val Tyr Leu Leu Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro

1

5

10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 14

Val Tyr Leu Leu Ser Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro

1

5

10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 15

Val Tyr Trp Pro Thr Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro

1

5

10

<210> 16  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 16  
Val Gln Pro Ser Ile Asn Arg Pro His Gln Arg Pro  
1 5 10

<210> 17  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 17  
Tyr His Asn Tyr Thr Thr Ala Pro His Ser Pro Ser  
1 5 10

<210> 18  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 18  
Lys Pro Val Ile Ser Pro Thr Asn Ala Leu Gln Pro  
1 5 10

<210> 19  
<211> 12

34

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 19

Val Thr Gly Pro Thr Lys Asn Leu Pro Ala Thr Thr

1

5

10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 20

Ala Ser His Val Asp Tyr Arg Arg Phe Leu Leu Thr

1

5

10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 21

Asp Gln Asp Phe Ala Pro Asp Arg His Tyr Arg Leu

1

5

10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 22

Gln Lys Trp Pro Glu Thr Tyr Pro Asp Leu Ser Phe  
1 5 10

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 23

Gly Asp Pro Val Pro Gln Thr Tyr Ser Ala Ala Gly  
1 5 10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

&lt;400&gt; 24

Ala Val Ser Val Asn Thr Lys Ile Asp Thr Glu Ala  
1 5 10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 25  
Gln Pro Asn Tyr Thr Ser Leu Leu Tyr Gly Thr Ala  
1 5 10

<210> 26  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 26  
Thr Gln Pro Pro Ile His His Tyr Gln Leu Pro Ala  
1 5 10

<210> 27  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
chemische Synthese

<400> 27  
Gly Trp Asp His Ile His Gly Val His Gln His Val  
1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**